第 37 卷第 7 期 生 态 学 报 Vol.37,No.7
2017 年 4 月 ACTA ECOLOGICA SINICA Apr.,2017

DOI: 10.5846/stxb201601030009
徐延年,邵剑文.华东地区两种植被带内天女花的遗传结构.生态学报,2017,37(7):2253-2262.
Xu Y N,Shao J W.The genetic structure of *Oyama sieboldii* (K.Koch) N.H. Xia & C.Y.Wu within two vegetation zones in Eastern China.Acta Ecologica Sinica,2017,37(7):2253-2262.

华东地区两种植被带内天女花的遗传结构

徐延年[1],邵剑文[1,2,*]
1 安徽师范大学生命科学学院,芜湖 241000
2 安徽省重要生物资源保护与利用研究重点实验室,芜湖 241000

摘要:天女花是一种名贵的珍稀观赏树种,现已被列为国家Ⅲ级保护植物,其自然分布区的植被类型可大致分为温带落叶阔叶林带(长江以北)和暖温带常绿阔叶林带(长江以南)。华东地区是天女花分布比较集中的区域之一,也是两种植被带的分界区。论文采用微卫星标记对华东地区两种植被带内的 8 个天女花自然种群的遗传多样性和遗传结构进行了分析。结果表明:华东地区天女花种群遗传多样性与近缘种相比较低(N_A = 3.83、H_O = 0.25、H_E = 0.40);大别山(落叶阔叶林带)种群的遗传多样性(均值为 H_O = 0.18 和 H_E = 0.28)明显低于皖南种群(常绿阔叶林带)的(均值为 H_O = 0.33 和 H_E = 0.51),并且两者已发生了明显的遗传分化;两种植被带内的种群特征(如种群大小、胸径或丛枝数)差异不显著,种群内年幼亚群体的遗传多样与年老亚群体相比没有发生显著的变化。因此,推测大别山天女花种群经历的种群历史较短(较皖南种群)是导致其遗传多样性较低的主要原因,建议两种植被带内的天女花种群应视为不同的进化单元进行保护,当前仍应以就地保护为主。

关键词:天女花;遗传多样性;遗传结构;植被带;保护建议

The genetic structure of *Oyama sieboldii* (K.Koch) N.H. Xia & C.Y.Wu within two vegetation zones in Eastern China

XU Yannian[1],SHAO Jianwen[1,2,*]
1 *College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu* 241000, *China*
2 *The Key Laboratory of Conservation and Employment of Biological Resources of Anhui, Wuhu* 241000, *China*

Abstract: *Oyama sieboldii* (K.Koch) N.H. Xia & C.Y.Wu is a rare species and has been listed as the national Ⅲ grade protection plants in China. The species is naturaly distributed in two different zones of forest vegetation, i.e., temperate deciduous broad-leaved forest (North of the Yangtze River) and warm temperate evergreen broad-leaved forest (South of the Yangtze River). The east region of China is one of the concentrated distribution areas of *O. sieboldii*, and also is the boundary zone of these two different vegetations. The genetic diversity and structure of eight wild populations of *O. sieboldii*, within two different vegetations from Eastern China, were analyzed by microsatellite markers. The results indicated that the genetic diversity of *O. sieboldii* in this region was relatively low (mean N_A = 3.83, H_O = 0.25 and H_E = 0.40) and lower than its closely related species. The mean population size, diameter at breast height (DBH) and number of branch were not significantly different between populations from different vegetations. However, the genetic diversity of Dabieshan populations (mean H_O = 0.18 and H_E = 0.28), within the temperate deciduous broad-leaved forest, was significantly lower than that of the Southern Anhui populations (mean H_O = 0.33 and H_E = 0.51), within the temperate evergreen broad-leaved forest, and their genetic characters obviously differentiated from each other. The distinct population history might mainly explain the difference of genetic diversity between these two zones. The genetic diversity of young individuals was not

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31170317);生物环境与生态安全安徽省高校重点实验室资助项目
收稿日期:2016-01-03; **网络出版日期**:2016-08-30

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: shaojw@mail.ahnu.edu.cn

significantly lower than that of the old individuals within each population. Therefore, we proposed that the populations in Dabieshan area and Southern Anhui area should be considered as two different evolutionary significant units for conservation, and an *in situ* conservation strategy should be taken as the main protecting measures at present, given that the regeneration ability of wild populations was normal and the genetic diversity of young individuals did not significantly decreased.

Key Words: *Oyama sieboldii*; genetic diversity; genetic structure; vegetation zone; conservation strategy

木兰科植物由于具有较高材用、食用、药用及观赏和科研价值(古老的木本植物),且超过半数的类群已处于濒临灭绝的状态,现已引起了植物学研究者的广泛关注[1-5]。天女花(*Oyama sieboldii*(K.Koch)N.H. Xia & C.Y.Wu)又名小花木兰、天女木兰,属落叶小乔木,该植物零星分布于我国东北和华东地区(日本和朝鲜也有少量分布),是典型的第三纪孑遗植物。其叶肥厚,花大,色白香浓,提取物可作为化妆品、香料以及药品的原料,具有较高经济利用价值,也是东亚特有的名贵珍稀观赏树种[6]。但近年来由于气候变化,人为砍伐和过渡采挖,再加上其自身的原因,天女花分布区正逐步缩小,种群及个体数量锐减,现已被列为国家Ⅲ级保护植物(国务院环境保护委员会,中国珍稀濒危植物名录(第一批),1984)。现有关天女花的研究工作主要是针对其种群群落结构、种子萌发特性、生殖对策以及快繁技术等开展的[7-17],有关其种群的遗传多样性和遗传结构研究至今未见报道。

植被是指某一地区内全部植物群落的总称,是栖息地景观中最重要的特征之一,它为该地区的植物、动物和微生物的生存提供了必要的物质基础和环境[18],对区域内的动植物遗传特征有着重要的影响[19-21]。天女花现有野生种群分布区的植被大致可以分为两类,即长江以北的温带落叶阔叶林带和长江以南的暖温带常绿阔叶林带[22]。两种植被带内的天女花种群遗传多样性及遗传结构是否有差异?如果有差异,导致差异形成可能的因素是什么?弄清这些问题对该珍稀濒危植物遗传管理和有效保护措施的制订具有指导意义[23-24]。

因此,本文拟对两种植被带分界线两侧,即大别山区(温带落叶阔叶林的代表)和皖南山区(包括江西三清山种群,暖温带常绿阔叶林带的代表)各4个种群的种群特征(种群大小、平均胸径及丛枝数)进行调查研究,并通过8对高多态性的微卫星引物分析它们的遗传多样性及遗传结构特征,以期为天女花科学保护措施的制订提供指导。

1 材料和方法

1.1 样品采集及种群特征的调查

在查阅馆藏标本的基础上,于2013年6月对华东地区天女花可能的分布地点进行了调查和样品采集,共采集到8个自然种群(图1和表1),其中大别山山区4个和皖南山区4个(包括江西三清山种群),共223个植株,取幼嫩叶片硅胶干燥备用。对采样植株的地上丛枝数和最粗枝的胸径进行统计测量,并估测和统计种群大小(植株数)。



图1 天女花8个采样种群的地理分布图

Fig.1 The locations of the 8 sampled populations of *O. sieboldii*

1.2 总DNA提取和PCR反应

总DNA提取参照改良的CTAB法[25]进行,提取的产物在1%的琼脂糖中电泳检测DNA的质量。从近缘种中[4, 26]筛选出8对高多态性且扩增稳定的微卫星引物用于本实验,并对上游引物5′末端进行荧光修饰(FAM、HEX或TAMRA,表2)。PCR扩增反应在Bio-Rad iCycler PCR仪上进行,反应总体积为15μL,包括:

5 ng DNA 模板,1.5μL Buffer,2 mmol/L $MgCl_2$,0.2 mmol/L dNTP,0.4 U Taq 聚合酶,0.4μmol/L 引物。PCR 扩增程序为:95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,50—58℃退火 30 s(表 2),72℃延伸 30 s,25 个循环;95℃变性 30 s,53℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,10 个循环;72℃延伸 15 min。PCR 产物使用 fluorescence-based 基因电泳系统(ABI3730XL)进行数据自动化分析,用 GeneScan 3.7 分析软件(Applied Biosystems,USA)对微卫星基因型进行判读。

表 1　取样的天女花种群信息

Table 1　The locations and information of the studied populations of *O. sieboldii*

种群地理位置 Population site	位置 Location	纬度 Longitude	经度 Latitude	海拔 Altitude/m	样本数量 Number of samples	种群大小/株 Population size
天堂寨	安徽省,六安市,天堂寨	31°07′	115°46′	1000—1300	34	约 300
鹞落坪	安徽省,安庆市,鹞落坪	30°58′	116°06′	1000—1400	34	约 500
白马尖	安徽省,六安市,白马尖	31°06′	116°10′	1180	13	23
天柱山	安徽省,安庆市,天柱山	30°44′	116°27′	1370	33	约 300
牯牛降	安徽省,池州市,牯牛降	30°03′	117°27′	1553	28	约 150
黄山	安徽省,黄山市,黄山	30°07′	118°09′	1600—1750	33	约 500
清凉峰	安徽省,黄山市,清凉峰	30°05′	118°51′	1430	22	约 300
三清山	江西省,上饶市,三清山	28°54′	118°03′	1443	26	约 300

表 2　微卫星位点及引物特征

Table 2　The characterizations of the used SSR loci and their primers

位点 Primer	序列 Repeat motif	引物 Primer sequence(5′-3′)	退火温度/℃ Annealing temperature	荧光标记 Fluorescence	等位基因数 Number of alleles
M6D1	$(CT)_{43}$	ACTGGAGCAGTGCCTGGATA	52.2	HEX	8
		TCGCAACTGCGTGTTCTCAT			
M6D3	$(CT)_{22}$	ACATGGATAGTCGTTGGATA	50.0	FAM	10
		ACCCCACTGAAGACAAACAT			
M6D4	$(CA)_2(GA)_{15}$	CACCGTACCCTATCAGAACC	50.6	HEX	20
		ATTTTCAGCATCATCAGTTG			
M10D8	$(CT)_3C(CT)_{10}$	AGCCCTCTATACACGCACACAT	52.6	FAM	14
		CGGAGCTACAAGGAGCAGAATA			
M17D5	$(GA)_{19}$	TGCTGCTCGAAGTTCTGAAT	53.8	FAM	9
		CGTGCAGTAAATCAGGATGT			
STM0231	$(TC)_{28}$	AAATTGTTGTTCGGATGAT	50.0	TAMRA	16
		GTGAAGGGCCTTTATCTG			
STM0264	$(GA)_{33}$	AAGCAAAGCCTCCTAGGTC	58.0	TAMRA	13
		TCTACGCCTAACAGGTCTGTC			
STM0297	$(TG)_{11}(AG)_{27}$	TCCACGCAGCAACTCATC	55.0	HEX	15
		TGCATCAGGACGTTCTAGTCA			

1.3　数据分析

使用 Genepop 4.0[27] 软件检验引物是否存在连锁不平衡以及是否偏离 Hardy-Weinberg 平衡;使用 Micro-Checker 2.2.3[28] 软件检验各微卫星位点是否存在无效等位基因;使用 GenAlEx 6[29] 软件计算种群的等位基因数(N_A)、观测杂合度(H_O)、期望杂合度(H_E)和近交系数(F_{IS})等遗传参数;使用 Bottleneck 软件检测各种群在近期是否经历了瓶颈效应;使用 GENETIX[30] 软件计算种群间的遗传分化系数(G_{ST}和 F_{ST})和基因流(N_m);利用 TFPGA[31] 软件进行 Mantel 统计学检验种群间的地理距离与遗传分化程度的相关性。由于胸径和丛枝数与天女花生长的年限可能存在正相关性,为了检测各种群遗传特征的变化趋势,取胸径与丛枝数的中位数为

界,把种群内的个体分为年幼和年老亚群体,再通过上述软件分别计算两亚群体的遗传参数。统计分析在SPSS11.0 软件中进行,用单因素方差分析检验种群特征(胸径、丛枝数和种群大小)差异是否显著;分别用 Mann-Whitney U test 检验不同植被带内的遗传多样性参数差异显著性,用 Wilcoxon signed-rank test 检验年老和年幼亚群体的遗传多样性参数差异显著性。

在遗传结构上,用 Arlequin 3.5[32] 软件进行种群间和种群内的分子变异分析。使用 Structure 2.2[33] 中贝叶斯聚类法对所有个体进行聚类,K 值设为 9,10 个重复,使用混合模型,burn-in 设为 100000 和 run-length 设为 1000000,参照 Evanno 等[34] 计算 ΔK 值,分析可能的遗传结构;同时采用不基于遗传平衡原理的 GenAlEx 软件进行基于个体的主成分分析(PCoA)。采用 2MOD 0.2[35] 软件检测和计算各种群基因流和隔离漂变的相对强弱。

2 结果

经广泛查阅馆藏标本信息和调查,在温带落叶阔叶林植被带与暖温带常绿阔叶林植被带分界的长江两侧仅发现 8 个天女花自然种群(图 1 和表 1),其中 4 个位于长江以北的大别山区,属温带落叶阔叶林植被带(以下简称大别山种群);另 4 个位于长江以南,属暖温带常绿阔叶林植被带(以下简称皖南种群)。天女花自然种群植株数目差别较大,最小的为白马尖种群(BMJ,仅 23 个植株);最大的为黄山(HS)和鹞落坪(YLP)种群,植株数约 500 株,它们的胸径也比较粗,平均值分别为 4.37cm 和 4.89cm,明显大于其它种群($F_{7,212}$ = 9.652,P <0.001);各种群的丛枝数平均值从 3.73—6.36 不等,但种群间差异不显著($F_{7,212}$ = 1.993,P = 0.057)。两种植被带内的种群大小、胸径及丛枝数差异均不显(P >0.05)。

从日本厚朴(*Houpoëa obovata* (Thunberg) N. H. Xia & C. Y. Wu)和星花玉兰(*Yulania stellata* (Maximowicz) N. H. Xia)筛选出在天女花中能稳定扩增并具有多态性的引物共 8 对。它们对 223 个个体扩增共检测到 105 个等位基因,每个位点平均约 13 个基因(表 2),其中 M6D4 引物等位基因数最多(达 20 个),M6D1 引物最少(仅 8 个)。Micro-Checker 和 Genpop 软件在这些微卫星位点中仅检测出少量位点在个别种群中可能存在无效等位基因和连锁现象,未见任何位点在 3 个以上的种群中出现无效等位基因或与其他位点连锁。因此这 8 对微卫星引物可以用于天女花种群的遗传多样性和遗传结构的分析研究。

表 3 8 个天女花种群的遗传多样性参数、瓶颈效应及 2MOD 的分析结果

Table 3 The genetic diversity and the results of bottleneck and 2MOD analysis for studied populations of *O. sieboldii*

种群地理位置 Population site	N_A	H_O	H_E	F_{IS}	MD	MB	TPM	SMM	Mode-shift test	2MOD
天堂寨	2.38	0.16	0.31	0.50	2.76	4.10	0.039	0.500	L-shaped	0.690
鹞落坪	4.25	0.23	0.43	0.48	4.89	6.32	0.422	0.719	L-shaped	0.471
白马尖	1.75	0.18	0.19	0.06	1.78	4.00	0.922	0.922	L-shaped	0.752
天柱山	2.25	0.14	0.20	0.30	2.55	5.76	0.906	0.906	L-shaped	0.733
牯牛降	2.88	0.24	0.35	0.31	4.37	6.36	0.078	0.500	L-shaped	0.625
黄山	6.00	0.38	0.62	0.40	3.04	6.67	0.273	0.844	L-shaped	0.262
清凉峰	5.13	0.31	0.51	0.42	3.39	5.93	0.986	0.998	L-shaped	0.309
三清山	6.00	0.38	0.55	0.33	2.06	3.73	0.531	0.973	L-shaped	0.304

N_A: 等位基因数(Number of different alleles); H_O: 观测杂合度(Observed heterozygosity); H_E: 期望杂合度(Expected heterozygosity); F_{IS}: 近交系数(Inbreeding coefficient); MD: 胸径均值(The mean diameter at breast height); MB: 平均丛枝数(The mean branches); TPM: 两相突变模型(Two-phase mutation model); SMM: 逐步突变模型(Stepwise mutation model); L-shaped: 种群没有出现瓶颈效应(L-shaped distribution of alleles is expected in the absence of a bottleneck); 种群编号见表 1

8 个天女花自然种群的平均等位基因数(N_A)为 3.83,观测杂合度(H_O)为 0.25,期望杂合度(H_E)为 0.40,YLP 和 HS 种群的遗传多样性较高(H_E分别为 0.43 和 0.62,H_O为 0.23 和 0.38),BMJ 和 TZS 种群的遗传多样性较低(H_E分别为 0.19 和 0.20,H_O为 0.18 和 0.14)。大别山区(即落叶阔叶林带)种群的遗传多样性参数(N_A,H_O和 H_E)均显著低于皖南山区(见表 4)。8 个种群作为总体和两种植被带分别检验种群的遗传多样性

与种群特征(如大小、胸径及丛枝数)的相关性,仅发现皖南种群的期望杂合度(H_E)与种群大小有明显的正相关性(r=0.982,P=0.018),其它相关性均不显著(P >0.05);种群内部根据胸径或丛枝数分为年老和年幼亚群体的遗传多样性参数(N_A,H_O和 H_E)及近交系数(F_{IS})也不存在显著的差异(图 2)。种群近交系数(F_{IS})从0.06—0.50 不等,均明显偏离哈-温平衡(95%的置信区间已明显大于 0)。各种群均未检测到明显的瓶颈效应(表 4),总体而言天女花采样种群的基因流模型和漂变模型大致相当(2MOD 值平均为 0.52,表 4),但大别山种群更倾向于基因流模型(0.66),而皖南种群漂变模型更明显(0.38)。

表 4　大别山种群与皖南种群的遗传多样性参数均值及其统计分析结果

Table 4　The mean genetic diversity index and statistical analysis results of Dabieshan and Southern Anhui populations

	N_A	H_O	H_E	F_{IS}	MD	MB	2MOD
总平均值 Overall mean	3.83±1.74	0.25±0.95	0.40±0.16	0.35±0.14	3.11±1.08	5.36±1.21	0.52±0.21
大别山种群平均值 Mean of Dabieshan populations	2.66±1.10	0.18±0.04	0.28±0.11	0.34±0.20	3.00±1.33	5.05±1.17	0.66±0.13
皖南种群平均值 Mean of Southern Anhui populations	5.00±1.48	0.33±0.07	0.51±0.12	0.36±0.05	3.22±0.95	5.67±1.33	0.38±0.17
Z	−2.033 *	−2.323 *	−2.021 *	−0.000^{ns}	−0.577^{ns}	−0.866^{ns}	−2.021 *

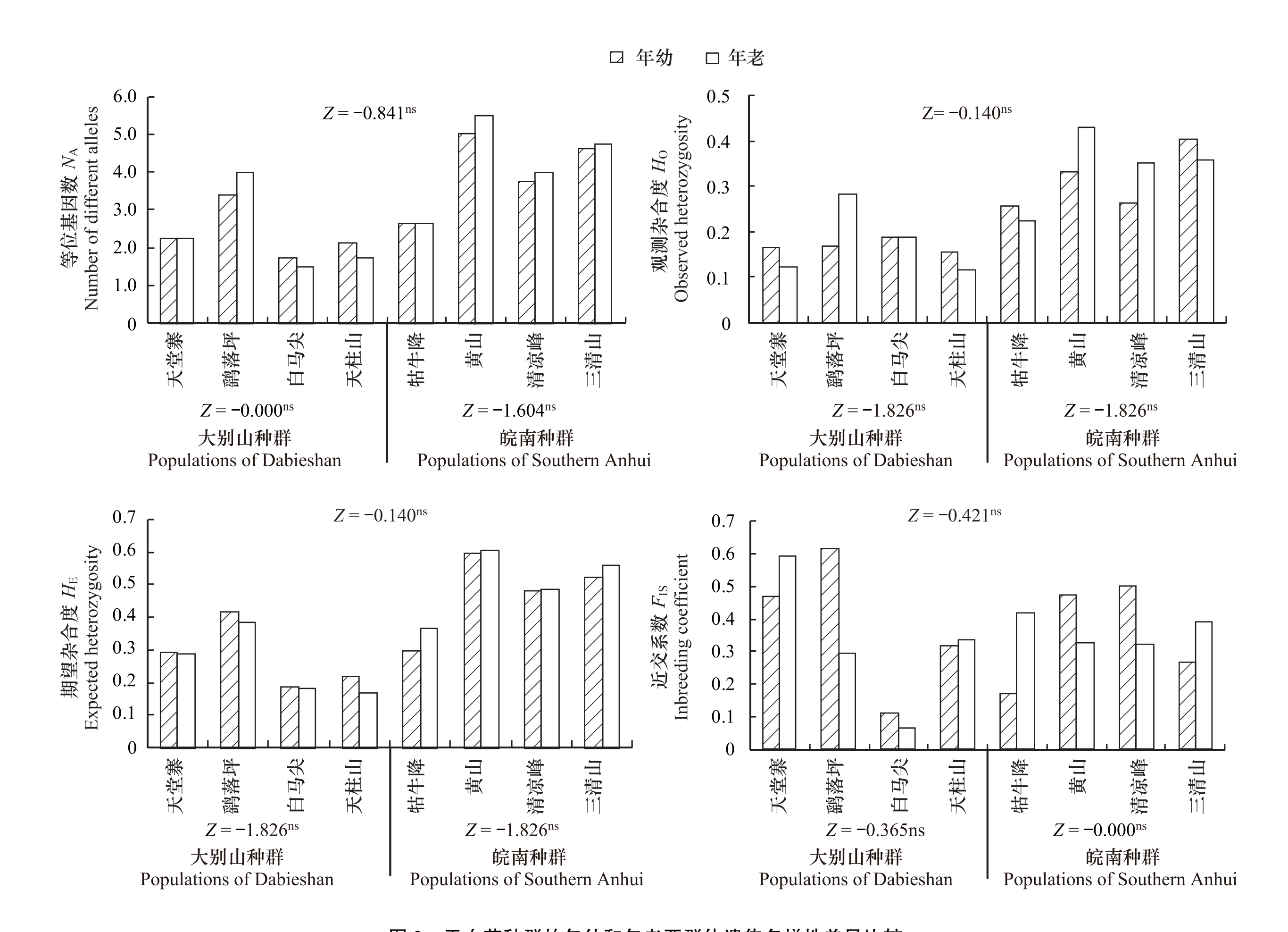


图 2　天女花种群的年幼和年老亚群体遗传多样性差异比较

Fig.2　The comparation of the genetic diversity between young and old sub-populations within populations of *O. sieboldii*

华东地区天女花种群间的遗传分化系数 G_{ST}均值为 0.315(表 5),其中最大值出现在 TZS 和 GNJ 种群间(G_{ST}=0.546),最小值出现在 TZS 和 YLP 种群间(G_{ST}=0.108)。大别山和皖南种群的平均遗传分化系数分别为 0.198 和 0.269,两者间差异不显著性($T_{1,11}$=1.882,P=0.089)。总体上种群间的遗传分化程度与地理距离

有正相关性(Mantel test: $r=0.436$, $P=0.020$),但两种植被带内这种正相关性并不明显($P>0.05$)。种群间的总体平均基因流 $N_m=0.340$,大别山种群的平均基因流为 $N_m=0.632$,高于皖南种群的 $N_m=0.352$。

表 5　8 个天女花种群间的遗传分化系数(G_{ST},对角线下)和地理距离(D,对角线上)/km

Table 5　Pairwise G_{ST} values (below the diagonal) **and geographical distances** (above the diagonal) **among the 8 sampled populations of *O. sieboldii***

	天堂寨	鹞落坪	白马尖	天柱山	牯牛降	黄山	清凉峰	三清山
TTZ		32	37	77	201	254	315	331
YLP	0.176		15	45	168	220	283	300
BMJ	0.314	0.146		48	170	218	281	304
TZS	0.285	0.108	0.157		123	176	240	255
GNJ	0.485	0.412	0.541	0.546		70	134	140
HS	0.323	0.271	0.378	0.383	0.298		67	137
QLF	0.320	0.254	0.334	0.310	0.285	0.219		151
SQS	0.348	0.284	0.422	0.408	0.329	0.233	0.249	

AMOVA 方差分析表明取样种群的主要遗传变异存在于种群间(占总变异的 54.16%),而且不同植被带内天女花的遗传特征已发生了明显分化,它们之间的差异占总遗传差异的 24.91%($P<0.001$,表 6)。主成分分析(图 3)和 STRUCTURE 分析的结果(图 4)也一致支持上述结果,不同植被带内的天女花种群均优先各自聚为一组。

表 6　天女花分子变异的 AMOVA 分析结果

Table 6　Hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) **within/among surveyed populations of *O. sieboldii***

变异来源 Source of variation	自由度 *df*	方差和 Sum of squares	变异组分 Variance components	占总变异比例/% Percentage of variation/%	显著性检验 Significance tests
组间 Among groups	1	258.230	0.87604	24.91	$P<0.05$
组内种群间 Among populations within groups	6	350.407	1.02847	29.25	$P<0.001$
个体间 Among individuals within populations	215	478.684	0.61434	17.47	$P<0.001$
个体内 Among individual within individuals	223	222.500	0.99776	28.37	$P<0.001$
总和 Total	445	1309.821	3.51661	100.00	

3　讨论

木兰科植物是现存被子植物原始类群的重要代表[36],据化石记录起源于白垩纪亚尔必期[37]。它们大多数为高大乔木,是重要的森林和用材树种,而且多数具有较高的药用和观赏价值。由于气候变化、自身生物学特性及人为干扰和过渡采伐等原因,现全球超过半数的物种已处于濒临灭绝的状态[3, 5]。木兰科植物野生种质资源的保护与可持续利用是当前刻不容缓的重要课题[3]。由于是古老的木本植物且具异交的繁育系统,木兰科植物的种群遗传多样性相对较高,种群间分化较小[38],如日本厚朴($H_O=0.88$, $H_E=0.87$)[39]、星花玉兰($H_O=0.666$, $H_E=0.719$)[40]、*Magnolia tomentosa* Thunb.($H_O=0.650$, $H_E=0.675$)[41]等。然而本文研究的天女花华东地区的 8 个自然种群遗传多样性却较低($H_O=0.25$, $H_E=0.40$),明显低于这些近缘种,也略低于天女花的日本亚种(*O. sieboldii* ssp. *japonica* K. Ueda, $H_O=0.360$, $H_E=0.427$)。但其种群间的遗传分化程度却较高(G_{ST}均值为 0.315),主要的遗传变异存在于种群间(占总变异 54.16%),明显高于它的近缘种厚朴(*Houpoëa officinalis* (Rehder & E. H. Wilson) N. H. Xia & C. Y. Wu)、长蕊木兰(*Alcimandra cathcartii* (J. D. Hooker & Thomson) Dandy)、星花玉兰等,也明显高于多年生植物的均值(0.19)和具异交繁育系统植物的均值(0.22)[42]。

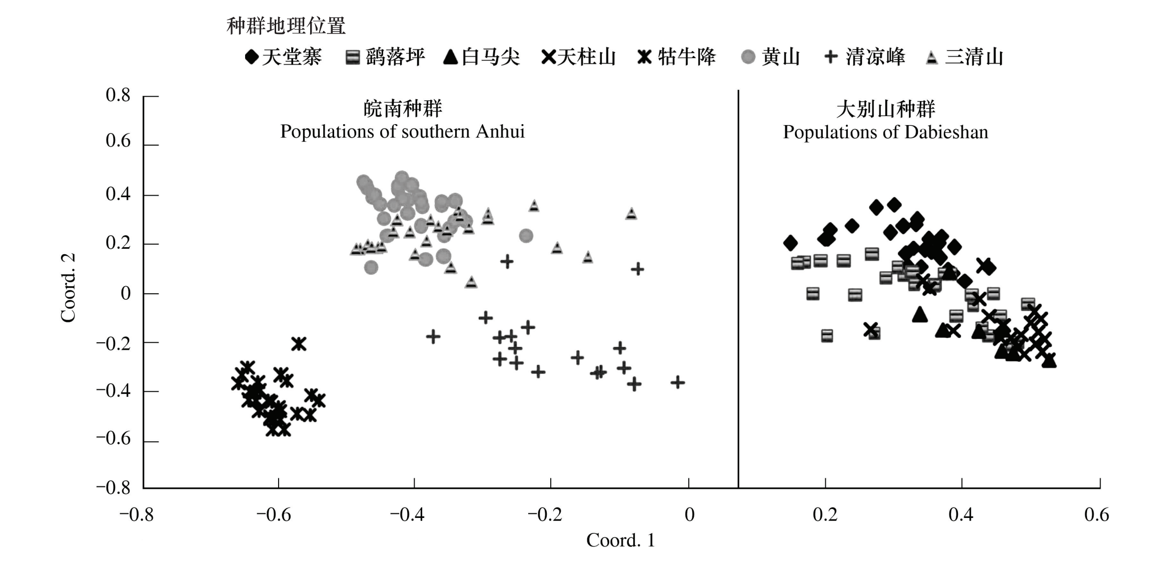




图 3　天女花 8 个种群遗传结构的主成分分析结果

Fig.3　Principal coordinates analysis (PCoA) for 8 sampled populations of *O. sieboldii*

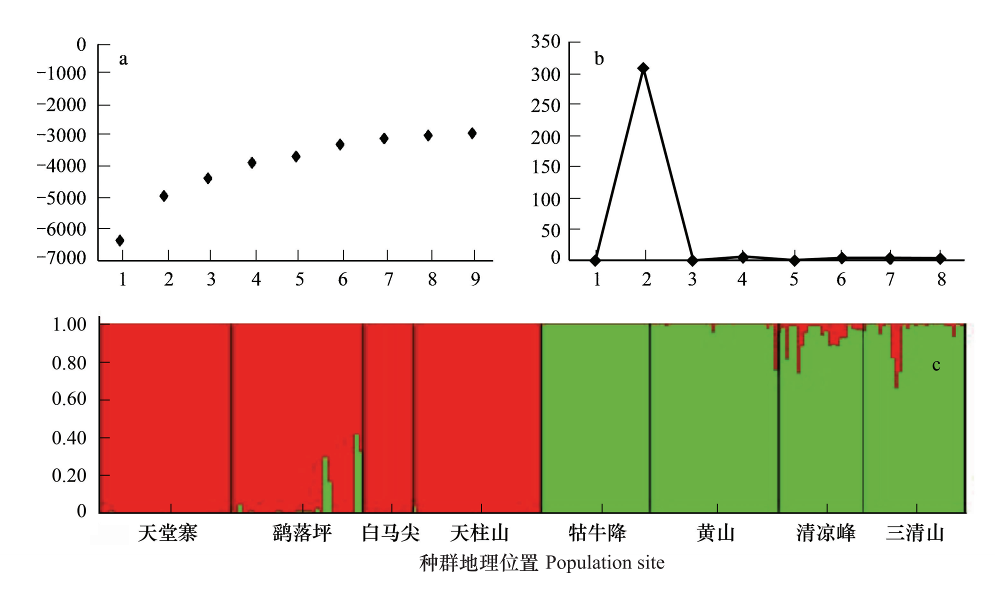


图 4　天女花 8 个种群的遗传结构 STRUCTURE 分析结果

Fig 4　STRUCTURE analyses results of 8 sampled populations in *O. sieboldii*

a:不同 K 值运算的 ln$P$(D)平均值; b:依据 Evanno 等(2005)计算的 ΔK 值; C: $K=2$ 时的个体分配柱形图;种群编号同表 1

物种的遗传多样性和遗传结构是其种群历史、繁育系统、基因突变、遗传漂变、基因流、自然选择等综合作用的结果[38]。对天女花而言,片断化岛屿状的生境、自交亲和的繁育系统及传粉昆虫缺乏可能是导致其遗传结构不同于近缘种(即种群内遗传多样性较低,种群间分化明显)的主要原因。天女花虽然分布较广,但间断分布明显,对生境要求比较高,喜凉爽、湿润的环境,多生于阴坡山谷。华东地区的天女花都局限分布于海拔 1000 米以上的阴坡山林,这些生境通常面积较小,呈典型的片断化岛屿状分布。而且这些生境内湿度大,气温较低,传粉昆虫通常缺乏,如于小丽等[43]和王立龙等[16]均研究发现天女花在自然状态下的结籽率很低(仅 13%左右),人工补授花粉可以显著提高其结籽率。再加上天女花虽然雌蕊较雄蕊先熟,但人工控制授粉实验表明其自花授粉也能座果并产生饱满种子,说明它仍然保留着自交亲和的繁育系统,以适应传粉昆虫不足,保障生殖成功。这些因素综合导致了天女花种群间基因流小($N_m=0.340$),不足以克服遗传漂变所带来的遗传负面效应,从而促使了种群的遗传多样性较低,种群间分化加剧[44]。

已有很多研究表明不同的生境或植被类型会对其区域内的动植物遗传多样性产生显著的影响[19, 45-46]。本文研究结果也表明天女花在两种植被带内种群的遗传多样性也存在显著差异,大别山区落叶阔叶林内的种群遗传多样性明显低于皖南常绿阔叶林内的种群(表 4)。一般来说,种群较大和较强的基因流有利于保存较高的遗传多样性[20, 47-48],但华东地区不同植被带内的天女花种群大小、胸径及丛枝数并没有显著差异,基因流反而是大别山区种群间较强(可能是由于地理距离较近的原因),种群内年幼亚群体的遗传多样性也并不显著低于年老亚群体,因此种群大小、基因流及人为活动应该不是导致大别山天女花种群遗传多样性较低的主要原因。野外调查发现,虽然天女花种群在长江以南的常绿阔叶林植被带有分布,但其种群均在海拔 1000m 以上,小生境仍然是落叶阔叶林,因此天女花应是典型的落叶阔叶林树种,它的分布区与落叶阔叶林密切关联。然而,在第四纪盛冰期时,落叶阔叶林向南退缩到了北纬 22°—30°附近,而北纬 30°以北是针叶林或非森林植被[22, 49]。因此在末次盛冰期时,天女花种群可能全部退缩到了北纬 30°以南,现北纬 30°以北的种群应是由北纬 30°以南的残存种群随着冰期后的气温回升向北逐步回迁而形成的。所以纬度越高,种群建立的历史相对越短,奠基者效应就越明显,种群遗传多样性也就越低,这可能是导致大别山区种群遗传多样性较低的主要原因,也可进一步推测华北地区的天女花种群遗传多样性可能更低(尚需进一步验证)。

物种保护的主要内容是保护其遗传多样性及进化潜力,种内遗传多样性越丰富,物种对环境变化的适应能力越强,其进化潜力也越大[50]。因此,物种遗传多样性及其遗传结构分析可以为珍稀濒危物种保护价值的评估以及保护策略的制订提供非常重要的信息[51]。对华东地区天女花遗传结构的研究分析表明,两种植被带内天女花的遗传多样性已发生了明显的分化,各自聚为一组(图 3 和图 4)。虽然大别山种群的遗传多样性显著低于皖南种群,而且它极有可能是冰期后气温回暖过程中低纬度种群向北回迁而形成的,但由于生境选择或遗传漂变等原因,它现与皖南种群在遗传上已发生了明显分化,遗传特征并不包含在皖南种群内(图 3 和图 4),因此建议大别山种群和皖南种群应视为独立的进化单元进行保护。与近缘种相比,虽然天女花种群的遗传多样性较低,种群间基因流较小,但考虑到它在两种植被带内的年幼亚群体与年老亚群体相比,遗传多样性均没有发生显著降低,预示着自然种群现处于基因流-隔离漂变平衡中[35]。再加上野外观察还发现天女花自然种群年龄结构比较稳定,并存在一定数量的幼苗,种群自然更新能力尚可。因此建议当今仍应以就地保护为主,尤其注意对其适宜生境的保护,在条件允许的情况下,可以适当辅以相同植被带内种群间的人工授粉,以增加其自然结籽率,来增强其自然更新的能力。

参考文献(References):

[1] Callaway D J. The world of magnolias. Portland, USA: Timber Press, 1994.

[2] Frodin DG, Govaerts R. World checklist and bibliography of Magnoliaceae. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, UK: Kew Publishing, 1996.

[3] 刘玉壶, 周仁章, 曾庆文. 木兰科植物及其珍稀濒危种类的迁地保护. 热带亚热带植物学报, 1997, 5(2): 1-12.

[4] Isagi Y, Kanazahi T, Suzuki W, Tanaka H, Abe T. Polymorphic microsatellite DNA markers for *Magnolia obovata* Thunb. and their utility in related species. Molecular Ecology, 1999, 8(4): 698-700.

[5] Cicuzza D, Newton A, Oldfield S. The Red List of Magnoliaceae. Fauna and Flora International, Cambridge, UK,2007.

[6] 傅立国. 中国植物红皮书:稀有濒危植物(第一册). 北京: 科学出版社, 1991.

[7] 杜凤国, 姜洪源, 郭忠玲, 王欢, 吕伟伟, 董研. 吉林濒危植物天女木兰种群分布格局与生态位研究. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2011, 35(3): 33-37.

[8] 杜凤国, 王欢, 刘春强, 杨德冒, 孙曙光, 王子明. 天女木兰群落物种多样性的研究. 东北师大学报: 自然科学版, 2006, 38(2): 91-95.

[9] 郭连金, 贺昱, 徐卫红. 三清山濒危植物天女花种群生殖对策研究. 植物科学学报, 2012, 30(2): 153-160.

[10] 陆秀君, 李天来, 倪伟东. 天女木兰种子休眠特性的研究. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(5): 703-706.

[11] 陆秀君, 刘月洋, 陈晓旭, 李天来. 天女木兰种子后熟期间的生理生化变化. 北京林业大学学报, 2009, 31(6): 164-168.

[12] 陆秀君, 徐石, 李天来, 张丽娟, 高爽. 天女木兰幼胚离体培养及组织快繁. 东北林业大学学报, 2008, 36(3): 5-7.

[13] 马吉龙, 李艳君. 天女花种子繁殖及其在园林中的应用栽培. 河北林果研究, 1999, 14(3): 238-241.

[14] 王欢, 杜凤国, 杨德冒, 孙曙光, 王子明, 刘春强. 天女木兰硬枝扦插繁殖初步研究. 北华大学学报: 自然科学版, 2005, 6(4): 352-354.

[15] 王立龙, 王广林, 黄永杰, 李晶, 刘登义. 黄山濒危植物小花木兰生态位与年龄结构研究. 生态学报, 2006, 26(6): 1862-1871.

[16] 王立龙, 王广林, 刘登义. 濒危植物小花木兰种子初步研究. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 2005, 28(1): 72-75.

[17] 顾地周, 禚畔全, 张力凡, 王秋爽, 张学士, 周繇, 朱俊义. 激素处理和变温层积对小花木兰种子形态后熟的影响. 植物研究, 2015, 35(1): 34-38.

[18] Honnay O, Jacquemyn H, Bossuyt B, Hermy M. Forest fragmentation effects on patch occupancy and population viability of herbaceous plant species. New Phytologist, 2005, 166(3): 723-736.

[19] Vellend M. Land-use history and plant performance in populations of *Trillium grandiflorum*. Biological Conservation, 2005, 124(2): 217-224.

[20] Vandepitte K, Jacquemyn H, Roldan-Ruiz I, Honnay O. Landscape genetics of the self-compatible forest herb *Geum urbanum*: effects of habitat age, fragmentation and local environment. Molecular Ecology, 2007, 16(19): 4171-4179.

[21] Yu FH, Krüsi BO, Schneller JJ, Schütz M, Tang M, Wildi O. Positive correlation between vegetation dissimilarity and genetic differentiation of *Carex sempervirens*. Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants, 2009, 204(9): 651-657.

[22] Harrison S, Yu G, Takahara H, Prentice I. Palaeovegetation (Communications arising): diversity of temperate plants in east Asia. Nature, 2001, 413(6852): 129-130.

[23] Young A, Boyle T, Brown T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. Trends in Ecology and Evolution, 1996, 11(10): 413-418.

[24] Jacquemyn H, Vandepitte K, Roldán-Ruiz I, Honnay O. Rapid loss of genetic variation in a founding population of *Primula elatior* (Primulaceae) after colonization. Annals of botany, 2009, 103(5): 777-783.

[25] Doyle JJ. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation. In: Hewitt GM, Johnston A, eds Molecular techniques in taxonomy Berlin: Springer, 1991, 283-293.

[26] Setsuko S, Ueno S, Tsumura Y, Tomaru N. Development of microsatellite markers in *Magnolia stellata* (Magnoliaceae), a threatened Japanese tree. Conservation Genetics, 2005, 6(2): 317-320.

[27] Rousset F. genepop'007: a complete re - implementation of the genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(1): 103-106.

[28] Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes, 2004, 4(3): 535-538.

[29] Peakall R, Smouse PE. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(1): 288-295.

[30] Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, Université de Montpellier II, Montpellier, 1996.

[31] Miller MP. Tools for population genetic analysis (TFPGA), version 1.3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, USA, 1997.

[32] Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(3): 564-567.

[33] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 2000, 7(4): 574-578.

[34] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology, 2005, 14(8): 2611-2620.

[35] Ciofi C, Beaumont MA, Swingland IR, Bruford MW. Genetic divergence and units for conservation in the Komodo dragon *Varanus komodoensis*. Proceedings of the Royal Society of London B, 1999, 266(1435): 2269-2274.

[36] Bremer B, Bremer K, Chase M, Fay M, Reveal J, Soltis D, Soltis P, Stevens P. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG Ⅲ. Botanical Journal of the Linnean Society, 2009, 161(2): 105-121.

[37] 刘玉壶. 木兰科分类系统的初步研究. 植物分类学报, 1984, 22(2): 89-109.

[38] Nybom H, Bartish IV. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics, 2000, 3(2): 93-114.

[39] Yuji I, Tatsuo K, Wajirou S, Hiroshi T, Tetsuto A. Microsatellite analysis of the regeneration process of *Magnolia obovata* Thunb. Heredity, 2000, 84(2): 143-151.

[40] Tamaki I, Setsuko S, Tomaru N. Genetic variation and differentiation in populations of a threatened tree, *Magnolia stellata*: factors influencing the level of within-population genetic variation. Heredity, 2008, 100(4): 415-423.

[41] Setsuko S, Ishida K, Tomaru N. Size distribution and genetic structure in relation to clonal growth within a population of *Magnolia tomentosa* Thunb. (Magnoliaceae). Molecular Ecology, 2004, 13(9): 2645-2653.

[42] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Molecular Ecology, 2004, 13(5):

1143-1155.

[43] 于小丽, 褚磊, 甄泉, 陈明林, 刘登义. 小花木兰居群繁殖生物学的初步研究. 安徽师范大学学报: 自然科学版, 2007, 30(4): 485-489.

[44] Slatkin M. Gene Flow in Natural Populations. Annual Review of Ecology and Systematics, 1985, 16(4): 393-430.

[45] Ortego J, Riordan E C, Gugger P F, Sork V L. Influence of environmental heterogeneity on genetic diversity and structure in an endemic southern Californian oak. Molecular Ecology, 2012, 21(13): 3210-3223.

[46] Shao J W, Wang J, Xu Y N, Pan Q, Shi Y, Kelso S, Lv G S. Genetic diversity and gene flow within and between two different habitats of *Primula merrilliana* (Primulaceae), an endangered distylous forest herb in eastern China. Botanical Journal of the Linnean Society, 2015, 179(1): 172-189.

[47] Rossum F V, Sousa S C D, Triest L. Genetic consequences of habitat fragmentation in an agricultural landscape on the common *Primula veris*, and comparison with its rare congener, *P. vulgaris*. Conservation Genetics, 2004, 5(2): 231-245.

[48] Vellend M. Parallel effects of land-use history on species diversity and genetic diversity of forest herbs. Ecology, 2004, 85(11): 3043-3055.

[49] Qian H, Ricklefs RE. Palaeovegetation (Communications arising): Diversity of temperate plants in east Asia. Nature, 2001, 413(6852): 129-130.

[50] 邹喻苹, 葛颂, 汪小全. 系统与进化植物学中的分子标记. 北京: 科学出版社, 2001: 140-149.

[51] Hamrick JL, Godt MJW. Effects of Life History Traits on Genetic Diversity in Plant Species. Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences, 1996, 351(1345): 1291-1298.